



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ศึกษาการอยู่รอดของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

(Survival of *Bacillus subtilis* spores in simulated stomach and intestine Condition)

จัดทำโดย

นาย เจษฎา เลิศชัยกิตติไพศาล รหัสนักศึกษา 44040181

นาย กฤษฏากร อัมพงษ์ รหัสนักศึกษา 44040750

นาย เอรಾವัตน์ นาคคฤทธีวงศ์ รหัสนักศึกษา 44040919

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... อติสร 4 พ.ย. 2547 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ. อติสร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โกหอสุมดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

ศึกษาการอยู่รอดของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

(Survival of *Bacillus subtilis* spores in simulated stomach and intestine Conditon)

โดย

1. นายกฤษฎากร อิมพงษ์ รหัสนักศึกษา 44040750
2. นายเอราวัฒน์ นาคฤทธิรงค์ รหัสนักศึกษา 44040919
3. นายเจษฎา เลิศชัยกิตติไพศาล รหัสนักศึกษา 44040181



T096844

ปพ.

ก279๔

๒54๗

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....96844.....

วัน,เดือน,ปี.....5 JUN 2009.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กฤษฎากร อัมพงษ์, เกษฏา เลิศชัยกิตติไพศาล และเอราวัฒน์ นาคคฤหวิวงศ์.2547 : ศึกษา
การอยู่ของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลอง. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. อติสร เสวตวิวัฒน์
:จำนวน 26 หน้า

จากการศึกษาการอยู่รอดของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลองโดยเริ่ม
จากการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* มา 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหาร คือสายพันธุ์
เบอร์ 14945,14947และ14948 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร NB เพื่อหาสายพันธุ์สปอร์ที่สร้างสปอร์
ได้มากที่สุด จากนั้นนำสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้มากดังกล่าว นำสายพันธุ์ที่ได้ดังกล่าวมาทดลองดู
การอยู่รอดในกระเพาะจำลองที่ระดับพีเอช 2 ,3 ,7 ,2 ผสม Skimmed milk ซึ่งผลการทดลอง
เพาะเลี้ยงเชื้อจนสร้างสปอร์ในอาหาร NB พบว่าทุกระดับพีเอชที่นำมาผ่าน ต่อลำไส้จำลองที่ระดับ
พีเอช 8 โดยการตรวจนับสปอร์ด้วยวิธีการ Pour plate พบว่าที่ระดับพีเอช 2 และพีเอช 3 นั้น
หลงเหลือจำนวนสปอร์น้อยในระดับที่ใกล้เคียงกันมาก แต่พบว่าที่ระดับพีเอช 7 และ 2 Skim milk
เหลือจำนวนสปอร์มากในระดับที่ใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่าในการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก ถ้า
ให้สัตว์กินสปอร์เพียงอย่างเดียวเข้าไปในขณะที่กระเพาะมีพีเอชเป็นกรด (พีเอช 2 หรือ 3) ความ
เป็นกรดในกระเพาะมีผลทำให้สปอร์ของสายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* ลดลงเหลืออยู่ประมาณ $3-6 \times 10^7$ cfu/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยจนอาจไม่เพียงพอที่จะผ่านไปยังเจริญต่อในปลายลำไส้เล็กจนถึง
ลำไส้ใหญ่ได้ แต่ในกระเพาะที่มีพีเอชเป็นกลาง (พีเอช 7) สปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* มี
ปริมาณการอยู่รอดมากซึ่งให้ผล เช่นเดียวกับกระเพาะจำลองในระดับพีเอช 2 ผสม Ski mmed milk
ซึ่งแสดงได้ว่าถ้ามีการให้สัตว์กินอาหารที่ผสมสปอร์ของเชื้อดังกล่าวแทนการกินสปอร์ล้วน
อาหารจะช่วยให้การอยู่รอดของสปอร์ผ่าน ไปจนถึงลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ได้ในปริมาณมาก แม้ว่าพี
เอชในกระเพาะจะอยู่ในระดับพีเอช 2 ก็ตาม ดังนั้นสปอร์ของสายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* จึงเป็น
สายพันธุ์หนึ่งที่ดีและเหมาะสมต่อการนำไปผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติกในกลุ่ม *Bacillus subtilis*
ต่อไปในอนาคต

.....
.....
.....
.....

.....
.....

.....
.....

ลายมือนักศึกษา

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

วันเดือนปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิชาปัญหาพิเศษในครั้งนี้กว่าจะสำเร็จลุล่วงออกมาได้ต้องประสบปัญหาต่าง ๆ มากมายซึ่งคณะผู้จัดทำต้องใช้ความอดทนต่อสู้ตลอดมาทั้งปัญหาภายในกลุ่มของผู้จัดทำเองและปัญหาจากการทดลองที่พบในขณะที่ทำการทดลอง จึงอยากจะขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยในการให้คำแนะนำและให้การสนับสนุนให้ทุกอย่างผ่านพ้นไปได้ด้วยดีตลอดเวลา

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ทำให้พวกข้าพเจ้ามีกำลังใจและกำลังใจทรัพย์ตลอดเวลา

ขอขอบคุณ ผศ. อติสร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้คำแนะนำกับกลุ่มข้าพเจ้าที่มีคำถามถามท่านตลอดเวลา โดยที่อาจารย์ก็ให้คำตอบกับพวกเราอย่างไม่รู้สึกเหนื่อยเช่นกัน

ขอขอบคุณกำลังใจจากเพื่อน ๆ ทุกคนที่เจอกัน พี่น้อง พี่เป็ พี่สุ และพี่ๆ ป. โททุกคนที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดเวลาการทำงาน

และท้ายที่สุดขอขอบคุณ กำลังใจพิเศษจากคนพิเศษที่คอยให้กำลังใจให้มีแรงในการทำงานครั้งนี้โดยไม่รู้สึกเหนื่อยเวลาคิดถึง ขอขอบคุณจริงๆที่มีพวกคุณทุกคน

กฤษฎากร

อิมพงษ์

เจษฎา

เลิศชัยกิตติไพศาล

เอรวิวัฒน์

นาคฤทธิรงค์

27 ตุลาคม 2547

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของปัญหา	1
1.2 ขอบเขตการศึกษา	1
1.3 วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	
2.1 ประวัติและความเป็นมา	2
2.2 Probiotic คืออะไร	2
2.3 คุณสมบัติ Probiotic	3
2.4 กลไกการทำงานของ Probiotic	6
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์	6
2.6 ปัญหาของ Probiotic	7
2.7 การพัฒนาในอนาคต	8
2.8 กลไกการทำงานที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์	8
2.9 คุณสมบัติที่ได้อื่นๆ	9
2.10 ลักษณะการทำงานของ Probiotic ที่ดี	10
2.11 หลักการทำงานของ Probiotic ที่ดี	10
2.12 ประโยชน์ของการใช้ Probiotic ผสมอาหารสัตว์	11
2.13 การใช้ร่วมกันระหว่าง Probiotic และยาปฏิชีวนะ	11
2.14 ลักษณะของ <i>Bacillus subtilis</i>	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
3.2 สถานที่ทำการทดลอง	14
3.3 อุปกรณ์	14
3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์	15
3.5 วิธีการศึกษา	15
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด	20
4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองกระเพาะและลำไส้ ของสปอร์สายพันธุ์ 14947	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	26
ภาคผนวก ข สารที่ใช้เตรียมกระเพาะและลำไส้จำลอง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 2.1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ ระหว่างโปรไบโอติกกับยาปฏิชีวนะ	12
ตาราง 4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด	20
ตาราง 4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะของกระเพาะและลำไส้ของ สายพันธุ์ 14947	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 4.1 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนสปอร์ที่อยู่รอด ในสภาวะแตกต่างกัน	22



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันสามารถทดสอบเพื่อหาปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในอาหารที่ระดับต่างๆ กันได้ กล่าวคือที่ระดับหนึ่งต่อพันล้านส่วนหรือต่อล้านล้านส่วน ถึงแม้ว่าจะมีเพียงเล็กน้อยแต่ก็สามารถพิสูจน์ให้เห็นถึงอันตรายที่อาจเกิดได้ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นเครื่องเตือนใจสำหรับผู้บริโภค

ความเป็นพิษ, มะเร็ง, ความพิการแต่กำเนิด และการต่อต้านยานั่นล้วนเป็นปัญหาสำคัญที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อสาธารณชนเนื่องมาจากการตกค้างของยาและฮอร์โมนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์, นม และไข่ ในประเทศสวีเดน ได้มีการสั่งห้ามอาหารสัตว์ผสมยาปฏิชีวนะ ส่วนประเทศกลุ่มประชาคมร่วมยุโรปได้เพิกถอนการใช้ฮอร์โมนกับเนื้อวัว และได้มีการโต้แย้งเกี่ยวกับ sulfamethazine ในสหรัฐอเมริกา สิ่งเหล่านี้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการตื่นตัวเกี่ยวกับสารเคมีหรือสารเร่งการเจริญเติบโตที่ไม่มีความเป็นธรรมชาติอย่างเพียงพอ

จากการได้ตระหนักถึงในเรื่องนี้ของประชาชนประกอบกับการขยายตัวของมหาวิทยาลัย และการวิจัยทางด้านอุตสาหกรรม ส่งผลให้มีการใช้สารเร่งการเจริญเติบโตที่เป็นธรรมชาติ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีความหมายหลากหลายด้วยกันแต่เป็นคำจำกัดความของ โปรไบโอติกซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร

1.2 ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบเชื้อ 3 สายพันธุ์ ในกลุ่ม *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ของบริษัท ยูเนียนแอสแทป จำกัด โดยเลือกเชื้อในกลุ่มที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดในสภาวะที่กำหนด
2. ศึกษาการอยู่รอดของสปอร์เชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตสปอร์มากที่สุดในกระเพาะและลำไส้เทียมที่ระดับพีเอชต่างๆ กัน โดยเปรียบเทียบกับพีเอช 2 Skimmed milk

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเลือกสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดโดยจะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกที่ประโยชน์สูงสุด ในด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์
2. เพื่อศึกษาการทนต่อสภาวะของกระเพาะเทียมที่ระดับพีเอชต่าง ๆ และลำไส้จำลองเพื่อดูความเป็นไปได้ของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ที่คัดเลือกต่อเพื่อนำไปผลิตเป็นโปรไบโอติก

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

2.1 ประวัติและความเป็นมา

ความจริงในวงการสัตวแพทย์ได้เรียนรู้ถึงปัญหาของการขาดจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรคและทำประโยชน์ให้แก่สัตว์มานานแล้ว โดยเฉพาะในการอนุบาลลูกโคแรกเกิดที่มีปัญหาในการที่ไม่สามารถย่อยอาหารและนมได้ดี และในการบำบัดรักษาโรคท้องเสียในลูกโคโดยการให้กินอุจจาระของโคแม่หรือกากอาหารในกระเพาะส่วนรูเมน เพื่อควบคุมกลุ่มอาการที่กล่าวมาแล้วและได้ถือปฏิบัติกันตลอดมา แต่ก็ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดใดพวกใดเป็นตัวสำคัญ มีการทดลองเลี้ยงสุกรและไก่ในประเทศแถบสแกนดิเนเวีย โดยการนำเอากากอุจจาระตากแห้งผสมกับอาหารให้ไก่และสุกรกิน พบว่าการเจริญเติบโตทั้งในไก่และสุกรฝูงที่ทำการทดลองให้ผลในการเร่งการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และลดอัตราการเกิดโรคท้องเสียได้อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับในประเทศแถบยุโรปกลางได้พบว่าจุลินทรีย์พวกที่สร้างกรดแลคติก สามารถที่จะทำให้สภาวะของลำไส้คนเกิดการสมดุล เป็นที่มาของการผลิตนมเปรี้ยวอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบันนี้นักวิชาการจึงสรุปว่าพวกจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างกรดแลคติก เป็นตัวการสำคัญในการออกฤทธิ์สร้างสมดุลในลำไส้ของคนและสัตว์ จึงมีการศึกษาค้นคว้าและทำการทดลองทำให้ได้มาซึ่งสารที่เราเรียกว่า ตัวเสริมชีวิต (Probiotics)

2.2 Probiotics คืออะไร

Probiotics คือ จุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อปรับจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารให้อยู่ในสมดุลที่เหมาะสม เสริมสร้างการทำงานในระบบทางเดินอาหาร การย่อยและกลไกต่างๆ ในการใช้อาหารของสัตว์ให้ดีขึ้น จุลินทรีย์เหล่านี้มีมืออยู่ในระบบย่อยอาหารปกติ เป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์และสิ่งมีชีวิต

คำจำกัดความนี้ ปรับปรุงมาจากของเดิมซึ่งกล่าวว่า สารเสริมชีวิต คือ จุลินทรีย์หรือสารซึ่งรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ เนื่องจากคำว่า สาร อาจทำให้เข้าใจผิดถึงสารปฏิชีวนะ ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้นเช่นกัน มาในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เสริมชีวิตใหม่ๆ นอกจากจะประกอบด้วยจุลินทรีย์แล้ว ยังมีสารซึ่งได้จากการหมักนอกตัวสัตว์ของจุลินทรีย์พวกเดียวกันนี้ผสมอยู่ด้วย ดังนั้น คำจำกัดความอาจเปลี่ยนได้ตามความก้าวหน้าของวิทยาการในด้านนี้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 คุณสมบัติของ Probiotics (สภาฯ คีรกบษราคม . 2543. ฉบับที่ 4 ปีที่ 1 เดือน 2543 .)

Probiotics ที่ดีควรประกอบด้วยคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non pathogenic bacteria) โดยผ่านการตรวจสอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยารวมทั้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องอื่นๆ โดยเฉพาะสถาบัน General Recognised As Safe (GRAS) ซึ่งมีจุลินทรีย์น้อยมากที่ได้รับการรับรอง
2. ควรเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (gram positive) เนื่องจากสามารถทนทานต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าเพราะมีผนังเซลล์หนาประมาณ 20 – 80 นาโนเมตร ซึ่งหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ
3. ควรจะทนกรดได้ดี เพื่อให้สามารถเดินทางผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะความเป็นกรดสูงได้
4. ควรจะสามารถสร้างกรดได้ดี เพื่อช่วยปรับสภาวะในระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์พวกโคลิฟอร์ม เช่น กรดแลคติก
5. เจริญเติบโตได้ง่ายและสามารถเติบโตได้ในอาณาบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย
6. เพิ่มจำนวนได้เร็วคือมีค่า Generation time สูง และมีความสามารถในการยังชีพอยู่ได้ในลำไส้สัตว์
7. ควรจะเป็นตัวยับยั้งที่ดี ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารแอนตี้ – อี โคไลแฟคเตอร์ (anti *E.coli* factor) ได้มากเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออีโคไล
8. เป็นสายพันธุ์ที่ให้คุณค่าแก่สัตว์ เช่น เพิ่มการเจริญเติบโต การต้านทานโรค กล่าวคือมันช่วยย่อยสลายกากอาหารให้ผลผลิต กรดอะมิโน กรดไขมัน และวิตามิน เป็นต้น
9. มีความคงตัวและอยู่ได้นานทั้งต่อการเก็บรักษาและใช้งานจริง
10. สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดที่มักจะมีพบหรือใช้ในการผสมอาหาร
11. ไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดกรรมพันธุ์การต้านยา
12. ไม่ก่อให้เกิดหรือสร้างสารพิษซึ่งสามารถคัดล้างในเนื้อสัตว์ได้
13. สร้างสารปฏิชีวนะ (Bacteriocin)
14. ต้องมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ ระหว่าง 20 – 60 องศาเซลเซียส

วิธีใช้ ในการใช้ probiotics มีข้อควรคำนึงดังต่อไปนี้

1. เลือกสายพันธุ์ให้เหมาะกับชนิดของสัตว์ที่จะใช้
2. ใช้ให้เหมาะกับอายุหรือระยะของสัตว์
3. ตรวจสอบคุณภาพของเชื้อก่อนใช้ ชนิดถูกต้อง เชื้อมีชีวิตทั้งก่อนผสมและหลังผสมอาหาร
4. ป้องกันการเสื่อมของเชื้อ โดยการเคลือบ (encapsulated)
5. ให้กินตามขนาดที่แนะนำและให้โดยต่อเนื่อง เพื่อให้มีจำนวนเชื้อเพียงพอในลำไส้ส่วนกลาง
6. ระวังการใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะ
7. อาหาร สภาพแวดล้อม และสภาวะของสัตว์ มีผลต่อประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะ

เนื่องจาก probiotics เป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ข้อสังเกตในการใช้มีดังนี้

1. ควรมีการตรวจสอบเชื้อก่อนใช้ ทั้งชนิด และความมีชีวิต
2. วันล่วงอายุของผลิตภัณฑ์ซึ่งโดยทั่วไปมักกำหนดไว้ 1 ปี จากวันผลิต จะสั้นลงเนื่องจากการขนส่ง
3. ความคงทนของจุลินทรีย์ต่อสภาพอากาศซึ่งร้อนชื้น และรังสีจากดวงอาทิตย์ มีผลต่อจำนวนสิ่งมีชีวิต
4. ส่วนประกอบของอาหาร การผสมและการอัดเม็ดทำให้ความมีชีวิตสั้นลงปกติควรใช้ ใน 3 เดือน หลังผสม
5. สภาพของฟาร์มและสัตว์เลี้ยง ถ้ามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง จะไม่ช่วยให้ดีขึ้น probiotics ไม่ช่วยรักษาโรค
6. วิธีใช้ต้องถูกต้องตามลักษณะของผลิตภัณฑ์
7. การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์ม
8. ควรมีการทำการศึกษาทดลองในสภาพฟาร์มในประเทศ เพื่อความมั่นใจในผลการใช้ และเพื่อหาข้อสรุปในการใช้

จุลินทรีย์ที่ได้รับการคัดเลือกทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย เมื่อนำมาเติมในอาหารสัตว์ อาจใช้เพียงชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกันหลายชนิดระหว่างแบคทีเรียด้วยกันหรือระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา ไม่ว่าจะใช้แบบใด ผลที่ได้จากการใช้ที่ปรากฏและวัดได้อาจสรุปได้ดังนี้ (สุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ด้านอาหารสัตว์

- 1.1 เร่งการเจริญเติบโต มีผลเหมือนการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีสังเคราะห์ คือ ทำให้การเพิ่มน้ำหนัก อัตราการไข่ และขนาดฟองไข่ การให้นม คีชีน
- 1.2 เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อคีชีน เพิ่มอัตราการหมักและการย่อยอาหาร

2. ด้านสุขภาพสัตว์

- 2.1 ลดอัตราป่วยและตายของลูกสัตว์จากท้องร่วง
- 2.2 ลดอาการท้องผูกในสัตว์
- 2.3 เพิ่มความต้านทานโรคในสัตว์ สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น

3. ด้านสิ่งแวดล้อม

- 3.1 จุลินทรีย์พวกนี้หมดสภาพในสิ่งปลดปล่อย จึงไม่ตกค้างในน้ำทิ้ง มูล และวัสดุรองพื้นคอก
- 3.2 ไม่คงตัวในธรรมชาติ ไม่พบอยู่ในดิน จึงไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์และพืชทั่วไป รวมทั้งสัตว์น้ำและพืชน้ำ

เมื่อสัตว์กิน probiotics เข้าสู่ร่างกาย จุลินทรีย์จะทำงาน โดยต่อต้านกลุ่มของแบคทีเรียเคมในลำไส้บางกลุ่มโดยตรง มีผลให้เกิดความสมดุลของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์และที่มีโทษในร่างกาย ซึ่งมีผลต่อการใช้อาหาร หรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนี้

1. ลดจำนวนแบคทีเรียบางกลุ่มในลำไส้ โดย
 - 1.1 ผลิตสารต่อต้านเชื้อ เช่น กรดอินทรีย์ ทำให้ pH ต่ำลง แบคทีเรียที่มีโทษอยู่ไม่ได้
 - 1.2 แย่งอาหาร ทำให้แบคทีเรียที่มีโทษขาดอาหาร ลดจำนวนลง
 - 1.3 แย่งที่เกาะบนผิวลำไส้ ทำให้แบคทีเรียที่มีโทษถูกขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น
2. เปลี่ยนแปลงการใช้อาหาร
 - 2.1 เป็นแหล่งอาหารและวิตามินบางชนิด
 - 2.2 เพิ่ม / ลดการทำงานของเอนไซม์
3. กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค
 - 3.1 เพิ่มระดับแอนติบอดี
 - 3.2 เพิ่มการทำงานของตัวกินเชื้อแบคทีเรีย (Macrophage)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กลไกการทำงานของ probiotics

เมื่อสัตว์ได้รับ probiotics เข้าสู่ร่างกาย probiotics จะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญเติบโตหรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กทุกส่วน โดยเฉพาะการแทรกตัวอยู่ตามร่อง villi ของลำไส้ มีการย่อยสลายกากอาหารแล้วสร้างกรดแลคติก กรดแลคติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค การเกาะติดของมันจะแผ่กระจายทุกพื้นที่ที่ทำให้ปิดทางหรือการเกาะติดของจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรค เช่น แบคทีเรีย และไวรัส การที่มันเป็นตัวแปลกปลอมจะดึงดูดให้พวกแมคโครฟาจ (macrophage) เดินทางมามาก สามารถที่จะช่วยให้ร่างกายสร้างสิ่งเร้าต่อต้าน (Antibody) จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่ง (Local immunity) ได้ดีขึ้น นอกจากนี้มันยังมีความสามารถในการผลิตสารซึ่งจำเป็นต่อสัตว์ เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโน และวิตามิน วิธีการที่นอกจากจะผลิตกรดแลคติกและป้องกันการเกาะติดของเชื้อโรคแล้ว มันยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะอ่อนๆ (Bacteriocin) ในการทำลายจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรคอีกด้วย ซึ่งเป็นการทำงานของ probiotics ทั่วไปอย่างกว้างๆ

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์

ผลของกระบวนการอัดเม็ด

ผลิตภัณฑ์ probiotics ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรงประกอบด้วยจำนวนจุลินทรีย์ที่ชีสต์ที่รวมทั้ง *Lactobacillus (L. acidophilus)*, *streptococcus (S. faecium)*, *bacillus (B. subtilis)* และยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ปริมาณของจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับความสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์พวกที่อ่อนแอซึ่งไม่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเป็นอย่างยิ่ง อย่างเช่น ความร้อนและแรงกดดันจากกระบวนการอัดเม็ด ในทางตรงกันข้าม *bacilli* นั้นเป็นจุลินทรีย์พวกที่มีความเสถียรเป็นอย่างมากซึ่งสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในกระบวนการอัดเม็ด เนื่องจากความสามารถในการสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความดัน และความชื้นได้ ยีสต์และ *streptococci* มีความสามารถในการรอดชีวิตอยู่ได้ในระหว่าง พวก *lactobacilli* และพวก *bacilli*

จากการสำรวจของมหาวิทยาลัยของ Nebraska เพื่อวิเคราะห์หาผลของการอัดเม็ดที่มีต่อการมีชีวิตรอดและความเสถียรของ probiotics พบว่า ในการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของ *lactobacillus*, *streptococcus*, *bacillus* และยีสต์ที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆกัน มี 2 การทดลองได้ชี้ให้เห็น กล่าวคือในการทดลองครั้งแรก นักวิจัยจะใช้อาหารสุกที่ประกอบด้วยข้าวโพด, ถั่วเหลือง และไซสัต์ว์ 4 % การรอดชีวิตของจุลินทรีย์พวก probiotics ในการวิจัยที่ Nebraska จะถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดสินโดยกิจกรรมของมัน โดยทั่วไปจะแสดงในรูปของ log 10 counts สำหรับทุกๆหน่วยที่ลดลง ใน log 10 counts ซึ่งมีกานลดลง 10 กลุ่ม หรือมีจำนวนเซลล์ที่แท้จริงอยู่ 90 % ตัวอย่างเช่น การลดลงใน 10 วงจร log จาก 6 ไป 5 เป็นการลดเพียง 16.7 % แต่จะเทียบได้กับการลดลงของจำนวนเซลล์ที่แท้จริงจาก 1,000,000 ไป 100,000 หรือลดลง 90 %

ในการทดลองครั้งที่ 1 นั้น Bacillus จะถูกพบว่ามี ความทนทานต่อกระบวนการอัดเม็ดมากที่สุด มีเพียงจำนวนน้อยที่สูญเสียไปเนื่องจากการตาย ซึ่งมีการสังเกตหลังจากการอัดเม็ดที่อุณหภูมิ 52 องศา ถึง 102 องศา ยิ่งไปกว่านี้ อาหารที่บรรจุ Bacillus และถูกอัดเม็ดที่อุณหภูมิ 102 องศา จะถูกนำมาทดสอบความเสถียรเป็นเวลามากกว่า 8 สัปดาห์ จุลินทรีย์กลุ่ม Bacillus ในอาหารนี้ยังคงความเสถียรและมีชีวิตอยู่ได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยใน log 10 counts ระหว่าง 2 เดือนของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม ยีสต์ที่ถูกอัดเม็ดในระหว่างการทดลองที่ 1 จะมีการตายขึ้น ตัวอย่างเช่น ที่อุณหภูมิ 72 องศา ยีสต์จะสูญเสียไป 10 % ใน log 10 counts ซึ่งแสดงว่า จะมีการลดลง 99.97 % ของปริมาณยีสต์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่

2.6 ปัญหาของโปรไบโอติก

ในแง่ความเป็นจริง เราไม่สามารถที่จะหาโปรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเพียงพอได้อย่างในอุดมคติ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของมัน โปรไบโอติกบางชนิดไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ โดยเฉพาะความร้อนที่เกิดจากกระบวนการอัดเม็ด (pelletting) ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ความก้าวหน้าทางวิชาการทำให้สามารถเพิ่มขีดจำกัดในสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ได้ เช่น การเคลือบ (coated) เพื่อให้โปรไบโอติกสามารถเข้าสู่ลำไส้ได้ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มันจะทำงาน ได้ดีที่สุด

ในเรื่องของประสิทธิภาพการทำงานของโปรไบโอติกนั้น ได้ปรากฏว่ายังมีการถกเถียงกันอยู่บ้างถึงผลตอบแทนที่เกิดจากการใช้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เกษตรกรบางรายใช้ไม่ได้ผลในขณะที่บางรายใช้ได้ผล อีกทั้งไม่แน่ใจว่าผลตอบแทนที่ได้นั้นจะคุ้มกับการลงทุนที่เพิ่มขึ้นหรือไม่ ผลแตกต่างเหล่านี้เกิดขึ้นจากการใช้โปรไบโอติกในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม โปรไบโอติกนี้จะใช้ได้ผลดีในสภาวะที่สัตว์เกิดความเครียด เนื่องจากปัจจัยต่างๆ ทั้งนี้เพราะว่าในสภาพปกตินั้น จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารทั้งชนิดที่เป็นโบทและที่เป็นประโยชน์อยู่ในสภาวะสมดุล แต่ถ้าหากสัตว์เกิดความเครียดขึ้นเมื่อใดสภาวะสมดุลของจุลินทรีย์เหล่านี้จะเสียไป โดยจุลินทรีย์ที่เป็นโบทจะเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะมีปริมาณลดลง โดยเฉพาะพวก *E. coli* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นมาก ทำให้สัตว์แสดงอาการท้องเสีย เจริญเติบโตช้าและอ่อนแอ เป็นต้น แต่เมื่อเสริมโปรไบโอติกแล้วจะช่วยปรับสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ให้กลับสู่ปกติ สภาวะที่ใช้โปรไบโอติกได้ผลดี จากการสรุปของ ศุภชัย บุญนำมา และคณะ . 2543 .ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ช่วงหย่านมสัตว์
- ช่วงเปลี่ยนคอกหรือเคลื่อนย้ายสัตว์
- ช่วงที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน
- ช่วงเปลี่ยนอาหาร
- เมื่อสัตว์ถูกเลี้ยงในสภาพแออัด
- ภายหลังจากที่มีการใช้สารปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน โปรไบโอติกจะช่วยปรับสภาวะของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

2.7 การพัฒนาในอนาคต

โปรไบโอติก ยังใหม่สำหรับวงการอาหารสัตว์ทั้งในและต่างประเทศ ข้อมูลบางประการ เช่น การทำงานของเชื้อ ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน และยังมีความพยายามที่จะหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่จะช่วยเพิ่มมูลค่าการผลิตสัตว์ให้ดีขึ้น ผลการศึกษาค้นคว้าทั้งในด้านการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต การให้ผลด้านสุขภาพ แสดงว่าโปรไบโอติกให้ผลดีทั้งสองด้าน แต่มักไม่แสดงความแตกต่างที่ชัดเจนทางสถิติ การทดลองภาคสนามในแนวกว้างที่มีการวางแผนถูกต้องตามกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ยังมีจำกัด อย่างไรก็ตาม มีการพยายามใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์ ทำให้ไม่มีสารตกค้างในผลิตภัณฑ์และไม่ปนเปื้อนสิ่งแวดล้อม

2.8 กลไกการทำงานที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ (สุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543)

1. มีรายงานถึงผลที่ได้จากการเสริมแบคทีเรียแลคติกในอาหารสัตว์ที่แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งสามารถนำสารอาหารไปใช้ได้มีประสิทธิภาพขึ้น ดังต่อไปนี้ คือ
 - สามารถควบคุมการสังเคราะห์สารพิษประเภท Amines ภายในลำไส้เล็ก โดยมีการทดลองใช้ *L. acidophilus* เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ deaminase ภายในลำไส้เล็กซึ่งจะช่วยลดการท้องเสียในสัตว์ได้
 - สามารถปลดปล่อยกรดอะมิโนไลซีนในระหว่างการเจริญเติบโตในทางเดินอาหาร โดยมีการทดลองใช้ *L. fermentum* เสริมในอาหารสุกร โปรตีนต่ำ ผลปรากฏว่า สุกรกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วย probiotics ซึ่งสามารถผลิตไลซีนได้มีน้ำหนักมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และสารประกอบจากกระบวนการเมตาโบไลต์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้

3. แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้าง Bacteriocin ที่เป็นสารประกอบเปปไทด์ เช่น ไนซิน ไคโทคอกซิน และริวิทีริน เป็นต้น ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ และสามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะได้ จึงทำให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ไม่เกิดการคื้อยา นอกจากนี้สเตรปโทค็อกคัสสามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน เช่น ทริปซิน แพนครีเอติน เอนไซม์จากน้ำลายและกระเพาะอาหารจึงไม่ทำให้เกิดการคื้อยา

สำหรับโปรไบโอติกที่มีชื่อทางการค้าว่า โทโยเซอร์ริน ซึ่งประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus toyoi* จำนวน 1×10^9 สปอร์/กรัม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ ไม่เป็นโทษ ไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารสัตว์ได้ชั่วคราว หลังจากอยู่ในลำไส้ระยะเวลาหนึ่งก็จะถูกขับออกมากับอุจจาระ ไม่ถูกทำลายโดยน้ำย่อยในกระเพาะซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด เมื่อเข้าสู่ลำไส้สปอร์จะแตกตัวเป็นแบคทีเรียมีชีวิต

2.9 คุณประโยชน์ที่ได้

จากการสรุปของ ศุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543 ได้สรุปคุณประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกดังนี้

1. เมื่อใช้เสริมในอาหารพ่อแม่ไก่พันธุ์เนื้อพบว่า

- จำนวนของไข่ที่มีขนาดใหญ่เพิ่มขึ้น
- เปอร์เซนต์ไข่ที่นำฟักเข้าเพิ่มขึ้น แต่ทำให้เปอร์เซนต์ไข่ที่ไม่ได้มาตรฐานในการนำเข้าฟักลดลง

- จำนวนลูกไก่ที่ฟักออกทั้งหมดต่อฝูงและจำนวนลูกไก่ที่ได้ต่อแม่ไก่เพิ่มขึ้น

- สุขภาพของไก่ดีขึ้น และอัตราการตายลดลง เนื่องจาก probiotics ไปกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคชนิดไม่จำเพาะโรค (non-specific immunity) ให้สูงขึ้น และในขณะเดียวกันจะควบคุมหรือลดจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ (anti-infectious) ลง

2. มีรายงานว่า การให้หนูไม่ซังกิน *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* จะทำให้การตอบสนองในการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งในเซลล์และในของเหลวเพิ่มขึ้น

3. เมื่อใช้เสริมในอาหารสุกร พบว่า

- อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ลดอัตราการเจ็บป่วยของลูกสุกรหย่านมลงได้ในทุกระดับของการเสริม
- ประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มขึ้น
- น้ำหนักเพิ่มขึ้น

2.10 ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีความต้านทานต่อโรคดีขึ้น
2. ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ (non-pathogenic, non-toxic)
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอควรที่จะเดินทางไปยังทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ แต่สามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
5. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในสภาพเก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม
6. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในการผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการความร้อน แร่ธาตุเพื่อการอัดเม็ด และสภาพเป็นกรด หรือการ extrusion และ oxidation เช่น วัตถุดิบในอาหารสัตว์บางชนิดซึ่งช่วยในการถนอมคุณภาพอาหารสัตว์
7. ไม่ตกค้างในซากสัตว์
8. ราคาไม่แพง
9. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร
10. ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม
11. ไม่ทำให้เกิดการแพ้
12. เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรมได้

2.11 หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดย
 - สร้างสาร Antibacterial substance
 - ขัดขวางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
 - สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหาร
2. ช่วยระบบย่อยอาหาร โดย
 - สร้าง Lactic acid ทำให้กระเพาะมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น การย่อยอาหารดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สร้าง Beta-galactosidase ทำให้การใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำนมดีขึ้น
 - สร้างน้ำย่อย เช่น Pectinase, Cellulase
 - ลดพิษของ amine และ แอมโมเนีย
3. กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค โดย
- มีการสร้างสารแอนติบอดีมากขึ้น
 - เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งทำหน้าที่กินจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคหรือสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

2.12 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมอาหารสัตว์ (วรพจน์ สุนทรสุข และเกวลี จันทรพันธ์ . 2545.)

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ซึ่งอาจจะพบปัญหาการดื้อยาและสารตกค้าง
2. ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารในสัตว์ดีขึ้นทำให้การใช้น้ำตาลกลูโคสไปบวมดีขึ้น
3. ใช้ป้องกันโรคต่างๆเนื่องจากโปรไบโอติกทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น บดการเกิดโรคท้องเสียในสัตว์เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจะมีผลทำให้สูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
4. ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดเนื้องอกโดยโปรไบโอติกจะช่วยยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอกและลดการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามีน
5. ยับยั้งการสร้างคลอโรสเตอรอล
6. ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด ทุกระยะ (ยกเว้นเป็ด เนื่องจากไม่มีข้อแนะนำให้ใช้สำหรับเป็ด)
7. FDA ขอมรับว่าเป็น GRAS (Generally Recognized as Safe)

2.13 การใช้ร่วมกันระหว่างโปรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ

โดยหลักการแล้วไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับโปรไบโอติกเพราะยาปฏิชีวนะอาจทำลายโปรไบโอติก แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคเนื่องจากสัตว์ป่วยหรือเกิดโรคระบาดจะต้องทำการทดสอบประสิทธิภาพของโปรไบโอติกกับฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเพื่อไม่ให้ยาปฏิชีวนะทำลายโปรไบโอติกและจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (Normal flore) ของร่างกาย ดังนั้นการเติมโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ควรให้สัตว์ได้รับจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเข้าไปด้วย จะทำให้ร่างกายสัตว์ฟื้นคืนสู่สภาพปกติได้รวดเร็วขึ้น มีผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกหลายชนิด ที่มีส่วนประกอบของจุลินทรีย์หลายตัวรวมกัน ซึ่งสามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะบางตัวได้ เนื่องจากไม่มีการออกฤทธิ์ขัดขวางหรือทำลายซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สงวนลิขสิทธิ์ในชื่อของห้องสมุด

กันและกัน ดังนั้นการเลือกใช้โปรไบโอติกร่วมกับยาปฏิชีวนะจึงควรพิจารณาข้อบ่งชี้ให้ถี่ถ้วนซึ่งจะพบคุณสมบัติที่แตกต่างกันระหว่างโปรไบโอติกและยาปฏิชีวนะดังพอสรุปได้

ตาราง 2.1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ระหว่างโปรไบโอติกกับยาปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก	ยาปฏิชีวนะ
คุณสมบัติ <ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต 2. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. ไม่มีสารตกค้างในอวัยวะต่างๆ 5. ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ 	คุณสมบัติ <ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ 2. ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. อาจมีสารตกค้างในอวัยวะต่างๆ 5. อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์
การออกฤทธิ์ <ol style="list-style-type: none"> 1. สร้างกรดและลด pH ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค 2. ทำงานเฉพาะจงเฉพาะที่ 3. แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในระบบทางเดินอาหารและแย่งจับพื้นที่ทางเดินอาหารกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค 	การออกฤทธิ์ <ol style="list-style-type: none"> 1. ยับยั้งการสร้างโปรตีน DNA, RNA ของเซลล์มีชีวิต 2. มีการทำงานกว้างขวาง 3. ไม่มีการเพิ่มจำนวน

ที่มา (Klopper และคณะ ,1980)

2.14 ลักษณะของ *Bacillus subtilis*

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนขนาด 0.3x 2.2 ไมโครเมตร ถึง

1.2 x 7.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ด้วยการใช้แฟลกเจลลา *Bacillus* สามารถสร้างสปอร์ภายในเนื้อเยื่อของสัตว์ที่ตายแล้วหรือในดินเพื่อรอการพักตัว เมื่ออยู่ในดินแบคทีเรียจะอยู่รอดได้หลายปีโดยไม่ตาย และเมื่อถูกน้ำหรือดินที่ปนเปื้อนสปอร์จะงอกขึ้นใหม่ในดิน การนำสปอร์ไปใช้

เซลล์เรียกว่าเอนโดสปอร์ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดแคลนอาหารหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม เอนโดสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ เช่น กลม รี หรือ ทรงกระบอก และฝังตัวอยู่กลางเซลล์หรือด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เอนโดสปอร์มีสมบัติทนต่อแสงยูวี ความร้อนสภาวะแห้งและสารเคมีต่างๆ ได้ดีกว่าเซลล์มีชีวิต *Bacillus spp.* เจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงหลายชนิดแม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ โดยที่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อลักษณะของโคโลนี เช่น ลักษณะกลมหรือไม่กลม ทึบแสง มีสีครีม สีน้ำตาล บางสายพันธุ์มีสีแดง ส้ม ดำ *Bacillus spp.* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิกว้างคือ -5 -75 องศาเซลเซียส แต่ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญ และมีโคโลนีขนาดใหญ่ *Bacillus* บางสปีชีส์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง เช่น *B. stearothermophilus* เจริญได้ที่ 55-70 องศาเซลเซียส โดยปกติมักบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 37 องศาเซลเซียส *B.cereus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส *Bacillus* ทนความร้อนได้เมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ 2-25 เปอร์เซ็นต์ (Buchanan and Gibbons,1974)



บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Bacillus subtilis* 3 สายพันธุ์ คือ 14945,14947,14948 จากห้องปฏิบัติการโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเก็บไว้ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม (Nutrient broth) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ทำการบ่มไว้ถ่ายใส่อาหารเลี้ยง (Nutrient broth) ในฟลasksชมพู ปริมาตร 50 ml เพื่อเพิ่มปริมาณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก โครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3 อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง
2. หลอดแก้ว
3. จานเพาะเชื้อ
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. แuantงแก้วรูปตัวแอล
6. แuantงใส่หลอดทดลอง
7. ฐูป
8. เครื่องเขย่า
9. พีเอชมิเตอร์
10. บีกเกอร์ 500ml,1000ml
11. ขวดรูปชมพู 500ml
12. เทอร์โมมิเตอร์
13. hot plate
14. กระบอกตวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. NaCl
2. KCl
3. NaHCO₃
4. Pepsin
5. Pancreatin
6. Bile salt
7. NaOH
8. HCl conc.

3.5 วิธีการศึกษา

ตอนที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด
กระเพาะเทียม

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* 3 สายพันธุ์ คือ 45 47 48

ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปิเปตเชื้อจากหลอดทดลอง 1 ml

ใส่ใน flask ที่มี NB ปริมาตร 50 ml

เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

ดูดใส่หลอดทดลองเชื้อ 5 ml

Heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศา นาน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบให้โดยศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนที่ 2 ศึกษาสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ใช้เป็นอาหารสัตว์

นำสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว
 ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มี Nutrient broth ปริมาตร 10 ml



ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ถ้าเชื้อ 1 ml ลงใน flask ที่มี Nutrient broth ปริมาตร 50 ml

ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง



นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm



นำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 10,000 รอบ
 เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศา



เจือจางปริมาณเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85 % NSS ปริมาตร 10 ml



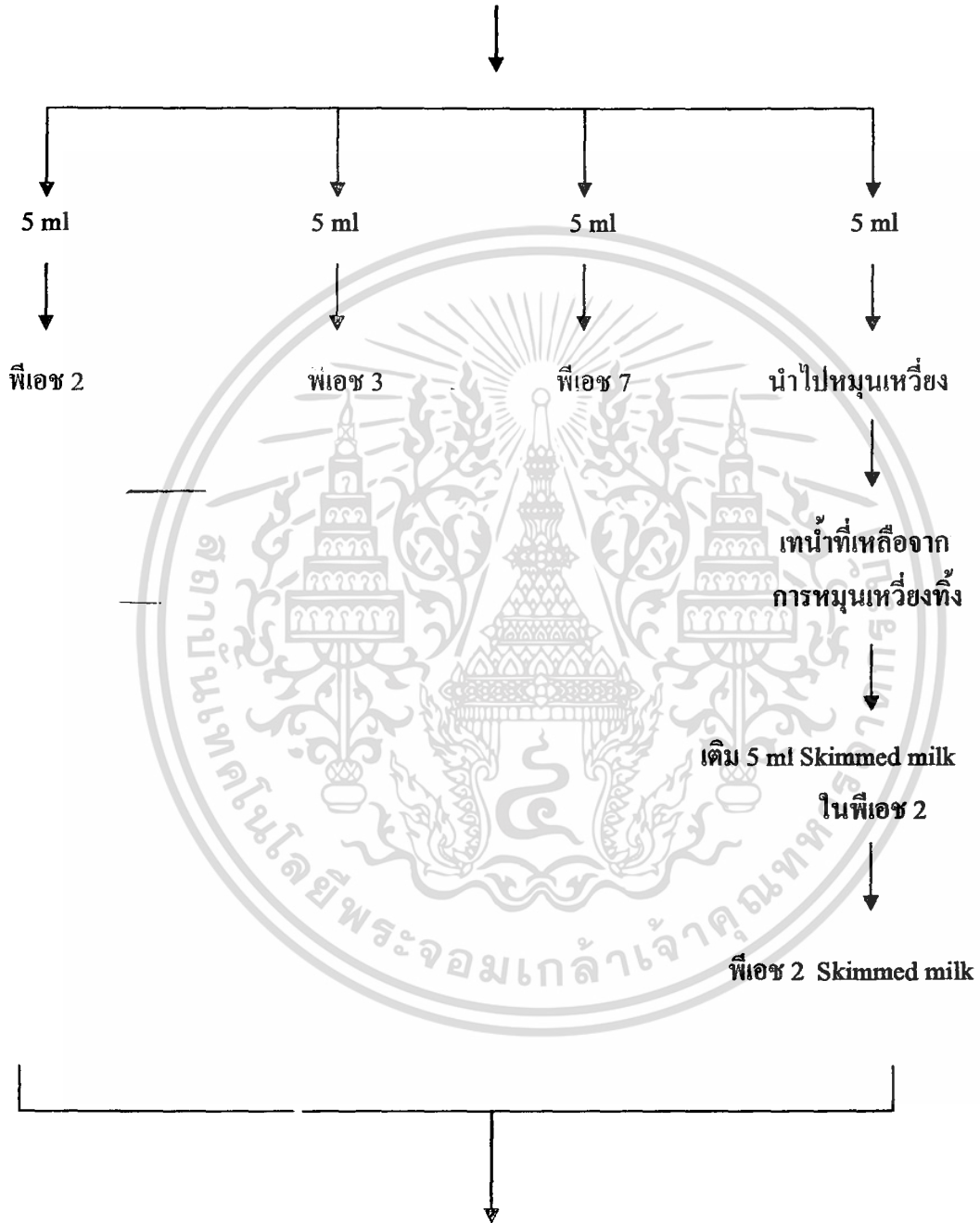
นำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 10,000 รอบ
 เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศา



เจือจางปริมาณเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85 % NSS ปริมาตร 20 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งสารละลาย 0.85 % NSS ปริมาตร 20 ml ที่มีเซลล์
ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ออกเป็นอย่างละ 5 ml



นำไปเขย่า 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ที่หลงเหลือในกระเพาะเทียม
โดยการ pour plate Technic ที่เวลา 0,90,180 นาที ในอาหาร Nutrient Agar

ลำไส้เทียม

ถ่ายเชื้อจากพีเอช 2,3,7,2 Skimmed milk
 จากในกระเพาะเทียม อย่างละ 5 ml

↓
 ใส่ลงใน พีเอช 8 ในแต่ละ flask

↓
 นำไปเขย่า 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศา

↓
 ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ที่หลงเหลือในลำไส้เทียม
 โดยการ pour plate Technic ที่เวลา 90,180 นาที ในอาหาร Nutrient Agar

หมายเหตุ ที่เวลา 0 นาทีของลำไส้เทียม คือ เวลา 180 นาทีในกระเพาะเทียม

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

จากการทดลองนำเชื้อ *Bacillus subtilis* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 14945 , 14947 และ 14948 ที่ได้ รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อมาทำการตรวจดูว่าสายพันธุ์ใดที่สามารถ สร้างสปอร์ได้มากที่สุด (ตาราง 4.1) โดยได้นำเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร Nutrient Broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง จากนั้นนำ เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm และทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar บ่ม เชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงผลดัง ตาราง 4.1 พบว่าสายพันธุ์ 14947 ตรวจนับจำนวนสปอร์ได้มากที่สุดคือ 9.0×10^8 CFU/ml รองลงมาคือสายพันธุ์ 14948 ตรวจนับ จำนวนสปอร์ได้ 2.9×10^8 CFU/ml และสายพันธุ์ 14945 ตรวจนับจำนวนสปอร์ได้น้อยที่สุด คือ 1.7×10^7 CFU/ml จากผลการตรวจนับจำนวนสปอร์ พบว่าสายพันธุ์ 14947 เป็นสายพันธุ์ที่มี จำนวนสปอร์มากที่สุดจึงเหมาะสมที่จะนำไปทำการศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะ และลำไส้

ตาราง 4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>	ผลการทดลอง
14945	1.7×10^7
14947	9.0×10^8
14948	2.9×10^8

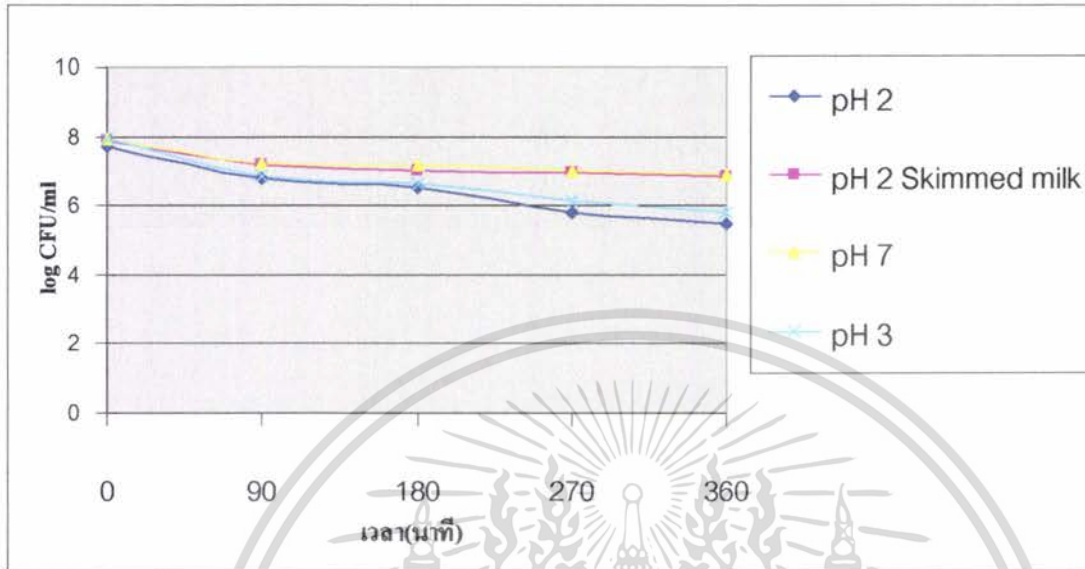
4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ของสปอร์สายพันธุ์ 14947

จากการศึกษาสปอร์ของสายพันธุ์ 14947 ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะเทียมโดยศึกษาในระดับพีเอช 2, 3, 7 และ skimmed milk (พีเอช 2) ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ที่เวลา 0 ,90 และ 180 นาที และผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม (พีเอช 8) ที่เวลา 0 (180 นาทีของกระเพาะเทียม), 90 และ 180 นาทีผลดังตาราง 4.2 พบว่าระดับ พีเอช 2 และพีเอช 3 มีจำนวนสปอร์หลงเหลืออยู่น้อยกว่าระดับพีเอช 7 และ skimmed milk (พีเอช 2) เนื่องจากพีเอช 7 มีสภาวะความเป็นกลางจึงไม่เกิดการทำลายสปอร์ของเชื้อ ทำให้มีสปอร์หลงเหลืออยู่มากเพียงพอผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม สำหรับ skimmed milk (พีเอช 2) มีสปอร์หลงเหลือเนื่องจาก skimmed milk ไปห่อหุ้มสปอร์ของเชื้อ สปอร์ของเชื้อจึงถูกทำลายจากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะเทียมได้น้อย ดังนั้นเวลานำเชื้อไปใช้เป็นโปรไบโอติกจึงควรให้สัตว์บริโภคในสภาวะที่กระเพาะสัตว์เป็นกลาง (พีเอช 7) หรือ ควรนำไปผสมกับอาหารแล้วให้สัตว์บริโภค เช่น skimmed milk (พีเอช 2) เพื่อให้มีสปอร์ได้หลงเหลือถึงลำไส้โดยสปอร์ของเชื้อจะไปยึดเกาะติดบริเวณผนังลำไส้ยึดพื้นที่ไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมายึดติดทำให้สัตว์เมื่อบริโภคอาหาร โปรไบโอติกเข้าไปมีภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคมมากขึ้นและมีสุขภาพดีขึ้นนอกจากนี้ยังเป็นการเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ ได้ด้วย

ตาราง 4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ของสปอร์สายพันธุ์ 14947

ปัจจัย	กระเพาะเทียม			ลำไส้เทียม	
	0 นาที	90 นาที	180 นาที	90 นาที	180 นาที
พีเอช 2	5.3×10^7	6.2×10^6	3.1×10^6	6.0×10^5	3.0×10^5
พีเอช 2 S	7.6×10^7	1.38×10^7	1.02×10^7	8.3×10^6	6.4×10^6
พีเอช 7	8.5×10^7	1.58×10^7	1.43×10^7	9.7×10^6	7.6×10^6
พีเอช 3	6.2×10^7	7.2×10^6	4.1×10^6	1.4×10^6	6.0×10^5

ภาพที่ 4.1 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนสปอร์ที่อยู่รอดในสภาวะแตกต่างกันของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้เทียม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองดูการเจริญและสปอร์สายพันธุ์ *B. subtilis* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 14945, 14947, 14948 ใน Nutrient Broth (NB) พบว่าสายพันธุ์ที่เจริญและสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด คือ สายพันธุ์ 14947 ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ดังกล่าว เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปในกระเพาะเทียม และลำไส้เทียม

จากการทดลองดูการทนต่อสภาวะกระเพาะเทียมและลำไส้เทียมของสายพันธุ์ 14947 ที่ได้นำมาผ่านกระเพาะเทียมและลำไส้เทียมระดับพีเอช 2, 3, 7 และ Skimmed milk (พีเอช 2) พบว่าจำนวน สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ระดับ pH 7, Skimmed milk (พีเอช 2) จะทนต่อสภาวะกระเพาะเทียมและลำไส้เทียมได้มากที่สุด ส่วนระดับพีเอช 2 และ 3 สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ไม่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะเทียมได้ สำหรับสปอร์ที่หลงเหลือจากกระเพาะเทียมเมื่อผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียมแล้วมีอัตราการลดลงน้อยมาก เนื่องจากในลำไส้เทียมมีสภาวะความเป็นด่าง (พีเอช 8) ในด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เมื่อต้องการนำเชื้อ *B. subtilis* มาใช้เป็นโปรไบโอติกให้เกิดประโยชน์สูงสุด ควรจะนำไปสัตว์บริโภคโดยนำไปผสมกับอาหาร เช่น Skimmed milk โดย Skimmed milk จะทำหน้าที่ห่อหุ้มและปกป้องสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* จากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะให้จำนวนสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* อยู่รอดจนถึงลำไส้ได้ เพื่อที่สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* จะไปเกาะติดและยึดพื้นที่ ไม่ให้เซลล์ก่อโรค ไปเกาะติดที่ผนังลำไส้ของสัตว์ได้ ทำให้สัตว์ที่บริโภคโปรไบโอติกเข้าไปมีภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคมมากขึ้นและมีสุขภาพดีขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ ได้ด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ในระหว่างขั้นตอนการถ่ายเชื้อจนถึงการบ่มเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ควรตรวจนับสปอร์ทั้งบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละเอียด
2. ควรนำงานเพาะเลี้ยงเชื้อไปอบก่อนนำไป Pour plate และ Spread plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ละอองน้ำระเหยและจุลินทรีย์ที่ตกค้างในงานเพาะเลี้ยงเชื้อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนมาในระหว่างการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- วรพจน์ สุนทรสุข และเกวลี จันทร์พันธุ์. 2545 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อกึ่ง , วิทยานิพนธ์ , มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี , กรุงเทพฯ
- ศุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต *Bacillus subtilis* ในอุตสาหกรรมโปรไบโอติก , รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543 , มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ.
- สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2543 . ทิศทางการวิจัยโรคกุ้งสดวรรณใหม่ KU Electronic Maganizine ฉบับที่ 4 ปีที่ 1 เดือน 2543. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- สุชาติ แก้วพรม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา
- Andreumont,A., 2000. Consequences of antibiotic therapy to the intestinal ecosystem. Ann. Fr Anesth. Reanim. 19,395-402
- Ashiuchi, M., Tani, K., Soda, K., Misono, H., 1998. Properties of glutamate racemase from *Basillus subtilis* IFO 3336 producing poly-gamma-glutamate. J. Biochem. 123,1156-1163
- Burgat, V., 1991. Residue of drugs of veterinary use in food. Rev. Prat. 41, 985-990
- Cavazzoni, V., Adami, A., Castrovilli, C., 1998. Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. Br. Poult. Sci. 39, 526-529
- Endo, T., Nakano, M., 1999. Influence of a probiotic on productivity, meat components, lipid Matabolism, caecal flora and metabolites, and raising environment in broiler production. Anim. Sci. J. 70, 207-218
- Fuller, R., 1989. Probiotic in man and animal. J. Appl. Bacteriol.66, 365-378.
- Jiraphocakul, S., Sullivan, T.W., Shahani, K.M., 1990. Influence of a dried *Bacillus subtilis* Culture and antibiotics on performance and intestinal microflora in turkeys. Poult. Sci. 69, 1966-1973.
- Nahashon, S.N., Nakaue, H.S., Mirosh, L.W., 1994. Production variable and nutrient retention in single comb white leghorn laying pullets fed diets supplemented with direct-fed microbials. Poult. Sci. 73, 1699-1711.
- Samznya,M. and Yamuachi, K., 2001. Morphological change of the intestinal villi in chicken fed dietary charcoal poeder,including wood vinegar compound. J.poult.sci.38:289-301.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Santoso, U., Tanaka, K., Ohtani, S., 1995. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, Body composition and hepatic lipogenic enzym activity in female broiler chicks. Br. J. Nutr. 74, 523-529.
- Santoso, U., Tanaka, K., Ohtani, S., Sakaida, M., 2001. Effect of fermented product from *Bacillus subtilis* on feed conersion efficiency, lipid accumulation and ammonia Production in broiler chicks. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 14, 333-337
- Shamoto, K. and Yamauchi, K., 2000. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poult. sci.* 79:718-723
- Sissons, J.W., 1989. Potential of probiotic organism to provent diarrhoea and promote digestion in farm animals: a review. J. Sci. Food Agric. 49, 1-13
- Tamura, M., 1989. Development of low-smelling natto. *Lifisci. Biotechnol.* 5, 104-108. In Japanese.
- Tournut, J., 1989. Applications of probiotics to animal husbandry. *Rev. Sci Technol. Off. Int. Epiz.* 8, 551-566

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nurtrient Agar

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L

Nurtrient Broth

Meat extract	5.0 g
Peptone	3.0 g

ภาคผนวก ข สารที่ใช้เตรียมกระเพาะและลำไส้จำลอง

ในสภาวะกระเพาะสัตว์จำลอง

NaCl	1.460g/200ml
KCl	0.150g/200ml
NaHCO ₃	0.755g/200ml
Pepsin	0.600g/200ml

โดยผสม NaCl , KCl , NaHCO₃ เข้าด้วยกัน 4 flask flask ละ 50 ml แล้วปรับ PH 2,3,7,2Skim milk อย่างละ 1 flask ก่อนนำมาผสมกับ Pepsin

ในสภาวะลำไส้จำลอง

ผสม 0.1% Pancreatin , 0.15% Bile Salt แล้วปรับพีเอช 8 จำนวน 4 flask flask ละ 50 ml